МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 619:616.98:576:636.32/.38
Е.А. Румянцева
(ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт Ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии) г. Покров, Владимирская область)

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ И ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ШТАММА «ММ/К-05» ВИРУСА БОЛЕЗНИ НАЙРОБИ, ИНАКТИВИРОВАННОГО ТЕОТРОПИНОМ

Введение

Болезнь Найроби – зооантропонозная, трансмиссивная болезнь овец и коз, проявляющаяся рецидивирующей лихорадкой, геморрагическим гастроэнтеритом, слизисто-гнойными выделениями из носа и диареей. Представляет опасность для человека, вызывая лихорадку и геморрагические явления [1,2].

Возбудитель болезни – РНК-содержащий вирус из семейства Bunyaviridae, рода Nairovirus. Вирионы имеют округлую форму, диаметром 80-120 нм. Они состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки толщиной 10-12 нм, на поверхности которой имеются характерные выступы длиной 5-10 нм. [1]

Впервые болезнь была обнаружена у овец в районе г. Найроби в Кении в 1910 г. Болезнь широко распространена в странах Африканского континента (Кения, Уганда, Заир, Танзания, Мозамбик), где протекает в виде периодических энзоотических вспышек. Согласно данным МЭБ, вспышки этой болезни были зарегистрированы уже на Ближнем Востоке (Кувейт, 1995 г.) и в Европе (Греция, 2003 г.), что указывает на расширение нозоареала этой инфекции. Существующие культурные и торгово-экономические связи России со странами, неблагополучными по болезни Найроби, создают угрозу заноса инфекции на территорию РФ. [4]

Основным резервуаром возбудителя в природе являются клещи Rhipicephalus appendiculatus, способные передавать его трансмиссивным путем на всех стадиях развития, а источником инфекции – больные животные и скрытые вирусоносители. [1,2]

В естественных условиях к возбудителю болезни Найроби наиболее восприимчивы овцы (особенно ягнята) и слабее – козы. Летальность молодняка этих видов животных может достигать 70-90%. [1]

В странах, неблагополучных по болезни Найроби, для профилактики используют живые вакцины, полученные путем серийных пассажей (140-150 пассажей) вирулентного вируса через мозг мышей. В литературе также имеются сообщения об испытаниях культуральной инактивированной метанолом вакцины, которая, однако, не нашла применения в практической ветеринарии. В то же время инактивированные препараты рекомендовано использо-

Таблица 1

Результаты инактивации культурального штамма «ММ/К-05» вируса болезни Найроби теотропином

№ п/п	Температура (Т°С)	Концентрация инактиванта (%)	Активность материала ($\lg$ ТЦД$_{50}$/см^3)			
			6 ч	12 ч	24 ч	48 ч
1	18,0±2,0	0,01	4,5	3,5	2,0	-
		0,05	3,5	2,0	±	-
		0,1	±	-	-	-
2	4,0±2,0	0,01	4,0	2,5	1,5	-
		0,05	3,0	1,0	-	-
		0,1	-	-	-	-

Таблица 2

Иммуногенные свойства инактивированного штамма «ММ/К-05» вируса болезни Найроби

№ гр.	Вводимый материал	Доза вводимого материала (см^3)	Кратность вакцинации	Титр ВН-антител	Реакция на контрольное заражение
1	Сорбированная (ГОА+сапонин)	2,0	двукратно	1:8	отсутствовала
		3,0		1:8	отсутствовала
		4,0		1:8-1:16	отсутствовала
	Эмульгированная	2,0		1:8	повышение t° тела на 5-6-е сут. до 40,0-40,2° С
2	Сорбированная (ГОА+сапонин)	3,0	однократно	1:2-1:4	угнетение, повышение t° тела на 4-7 сут. до 40,8-41,6° С
	Эмульгированная	3,0		1:2-1:4	
3	Контроль				угнетение, отказ от корма, диарея с примесью крови, повыш. t° тела до 41,8° С на 3-6 сут. Гибель на 9 сут.

вать в угрожаемых по болезни Найроби районах. [1,2,3]

Цель наших исследований: отработка режима инактивации теотропином аттенуированного культурального штамма «ММ/К-05» вируса болезни Найроби и изучение его антигенных и иммуногенных свойств.

Материалы и методы

В работе использовали аттенуированный культуральный штамм «ММ/К-05» вируса болезни Найроби, полученный в перевиваемой культуре клеток почки сайги (ПС) с активностью 6,0 $\lg$ ТЦД$_{50}$/см^3. Для контрольного заражения животных использовали вирулентный штамм вируса болезни Найроби с титром 5,0 $\lg$ ИД$_{50}$/см^3.

Исследования проводили на овцах романовской породы 3–12-месячного возраста.

В качестве инактиватора использовали теотропин, который широко применяется в ГНУ ВНИИВВиМ при разработке и изготовлении инактивированных вакцин против некоторых инфекционных болезней животных. Концентрацию инактиванта подбирали с учетом литературных данных по инактивации вирусов других таксономических групп (В.И. Балышева с соавт., 2002; В.В. Сливко, 2003).

Полноту инактивации вируса болезни Найроби определяли путем проведения пяти последовательных пассажей материала в культуре клеток ПС. Отсутствие на всех стадиях пассирования цитопатических изменений в культуре клеток указывало на полную инактивацию вируса.

Результаты и обсуждение

Инактивацию вируссодержащего культурального материала проводили теотропином с конечной концентрацией 0,1%; 0,05% и 0,01%. Учитывая литературные данные о нестабильности вируса болезни Найроби, материал инактивировали при температурах (18,0±2,0)° С и (4,0±2,0)° С. Результаты опыта представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, теотропин в концентрациях 0,01% и 0,05% при (18,0±2,0)° С полностью инактивировал вирус через 48 часов, при температуре (4,0±2,0)° С эти концентрации препарата инактивировали вирус через 48 и 24 часа, соответственно. Концентрация теотропина 0,1% оказалась высокотоксичной

для культуры клеток ПС, что затрудняло проведение исследования.

При изучении иммуногенности инактивированный культуральный материал объединяли с раствором гидроокиси алюминия с сапонином в конечной концентрации 0,6% и 0,1%, соответственно. При приготовлении эмульгированных форм использовали масляный адъювант Фрейнда в объемном соотношении с инактивированным материалом 1:5.

Овец иммунизировали подкожно в подмышечную область по 2 головы на каждый образец материала. Первую группу животных иммунизировали двукратно с интервалом в 14 суток инактивированным культуральным вирусом в виде нативного (ГОА+сапонин) и эмульгированного вируса. Сорбированный ГОА вируссодержащий материал вводили овцам в объеме 2,0; 3,0; 4,0 см^3. Двум ягнятам этой же группы вводили эмульгированный материал в объеме 2,0 см^3.

Вторую группу иммунизировали этими же образцами однократно объемом 3,0 см^3.

Перед контрольным заражением у опытных овец отбирали пробы крови для определения в сыворотках ВН-антител.

Через 14 суток после второй иммунизации опытных овец и одну контрольную заразили вирулентным штаммом вируса болезни Найроби в дозе 1000 ИД$_{50}$.

Результаты проведения иммунизации и контрольного заражения животных представлены в табл. 2.

Привитые животные оставались клинически здоровыми в течение всего срока наблюдения.

У овец, иммунизированных двукратно, ВН-антитела обнаруживались в титрах 1:8-1:16, у однократно привитых животных титр составлял 1:2-1:4.

После контрольного заражения все животные первой группы оставались клинически здоровыми.

У животных второй группы на 5-6-е сутки отмечали угнетение и повышение температуры в течение 4-5 суток до 40,8-41,6° С. Других клинических признаков, характерных для болезни Найроби, у животных этой группы не наблюдали.

Контрольная овца пала с характерными клиническими признаками болезни (отказ от корма, диарея с примесью крови, учащенный пульс, частое и тяжелое дыхание) на 9 сутки после заражения.

Выводы

Двукратная иммунизация животных инактивированным теотропином культуральным штаммом «ММ/К-05» вируса болезни Найроби предохраняла животных от заражения вирулентным вирусом болезни Найроби. Полученные данные могут быть использованы при разработке культуральной инактивированной вакцины против болезни Найроби.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты изучения влияния различных концентраций теотропина на инфекционную активность культурального штамма «ММ/К-05» вируса болезни Найроби, его антигенные и иммуногенные свойства. Двукратная иммунизация овец инактивированным материалом предохраняла животных от заражения вирулентным вирусом болезни Найроби. Полученные результаты могут быть использованы при разработке инактивированной вакцины против этой болезни.

SUMMARY

In the paper the results of study of the effect of different theotropin concentrations on infectious activity of the Nairobi sheep disease virus culture strain «MM/K-05», its antigenic and immunogenic characteristics are shown. The double immunization of sheep with the inactivated material protected animals from challenge with the Nairobi sheep disease virulent virus. The results obtained can be used for the development of an inactivated vaccine against this disease.

Литература

1. Вирусные болезни животных /В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко Б.В. Соловьёв, Н.В.Фомина // М.: ВНИТИБП 1998. С. 352-356.
2. Davies, F. G. A Nairobi sheep disease vaccine. /F.G. Davies, J. Mungai, and T. Shaw, //Vet. Rec. 1974. № 94, P. 128.
3. Davies, FG The antibody response in sheep vaccinated with experimental Nairobi sheep disease vaccines. / F.G. Davies, S. Otieno, D.M. Jessett // Trop. Anim. Health. Prod. 1977 Vol. 9, №3, P.181-183.
4. World situation //Nairobi sheep disease. Режим доступа: http // www.oie.int.